Nicht für den Austausch

Aus dem Anatomischen Institut der Universität zu Breslau.
Direktor: Professor Dr. W. Blotevogel.

Nachweis und Bedeutung des Vitamins C bei Knochen- und Muskelentwicklung

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
in der Medizin bei der Medizinischen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Lothar Klein
Medizinal-Praktikant

Breslau 1939

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Breslau.

Berichterstatter: Professor Dr. Blotevogel.
Dekan: Professor Dr. Gutzeit.

Sonderdruck aus Anat. Anz.

Nachdruck verboten.

(Aus dem Anatomischen Institut der Universität Breslau
[Direktor: Prof. Blotevogel].)

Nachweis und Bedeutung des Vitamin C bei Knochen- und Muskelentwicklung.

Von L. Klein.

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Bedeutung des Vitamin C für die regelrechte Entwicklung der Hartsubstanzen des tierischen Organismus, wie Zahn- und Knochengewebe, ist seit der Kenntnis der C-Mangelkrankheit bekannt. Die Veränderungen, die sich in diesen Geweben bei unzureichender Vitamin-C-Zufuhr abspielen, stellen mit den empfindlichsten Indikator für den Skorbut dar. Sie sind längst nachweisbar, ehe auffällige klinische Symptome zutage treten. Es war daher von Interesse, mit den zur Verfügung stehenden Nachweismethoden das Vitamin C in den in Frage stehenden Geweben zu verfolgen, um so näheren Einblick in die Beziehung des Vitamin C zu diesen Geweben zu gewinnen.

Demole, Cahen und Pfalz haben das Zahngewebe untersucht und dabei das Vitamin C in die Odontoblasten lokalisiert. Sie beschrieben dazu noch einen streifenförmigen Belag am Dentin, der aber nach allem, was bisher histochemische Vitamin-C-Untersuchungen ergeben haben, als Kunstprodukt aufzufassen ist. Das Vitamin C, das sich durch die histochemischen Methoden darstellen läßt, ist nämlich stets intrazellulär gelagert und dort an wohldefinierte Zellstrukturen gebunden.

Im Folgenden soll nun über das Ergebnis von Untersuchungen an embryonalem Knochengewebe und weiterhin an Skelettmuskelfasern berichtet werden.

Werkstoff und Untersuchungsart:

Zur Untersuchung kamen Schweineembryonen, die frisch aus dem Schlachthof bezogen wurden. Es waren Lebensstufen von 5—12 cm Scheitel-Steißlänge. Je ein etwa $^1/_2$ cm großes Stück wurde vom Femur abgetrennt und zur Untersuchung verwendet. Um ein besseres und rascheres Durchdringen der Flüssigkeiten zu erzielen, wurde die Haut und ein großer Teil der Muskulatur entfernt, so daß der Knochen selbst nur noch von einem dünnen Weichteilmantel umgeben war. Zum Nachweis des Vitamin C

diente das Goldchlorid, das sich bei embryonalen Geweben gut bewährt und vor allem eine nachfolgende ungestörte Entkalkung ermöglicht. Im einzelnen verlief der Gang der Untersuchung folgendermaßen:

1. Sofort nach der Entnahme kamen die Stückchen in reichliche 1proz. $AuCl_3$-Lösung, der pro ccm 2 Tropfen Eisessig zugesetzt waren; darin ca. 1 Stunde.
2. Spülen in reichlich destilliertem Wasser $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde.
3. Härtung durch Alkoholpassage bis zu 96% Alkohol.
4. Zurückführen zum Wasser und sodann Entkalkung in 5proz. Trichloressigsäure, wobei sich 20 Stunden als ausreichend erwiesen.
5. Nach Wässerung und Alkoholhärtung, Einbettung in Paraffin; Schnittlänge 5 μ; Nachfärbung mit Kernechtrot und Lichtgrün.

Bei der Schwierigkeit, die die Behandlung des Knochenmaterials in sich birgt, gelingt es nicht immer, vollkommen gleichmäßige Präparate zu erhalten. Häufig sind einzelne Stellen von Goldchlorid nicht genügend durchdrungen; doch fanden sich immer ausreichend große Stellen, die ein klares Bild ergaben.

Bei Betrachtung mit schwachen Systemen fällt zunächst eine oft tiefschwarz erscheinende Verfärbung der Osteoblasten auf, welche häufig wie von „Lack" überzogen aussehen. Bei stärkerer Vergrößerung und besonders bei Verwendung von Immersionssystemen und starker Lichtquelle zeigt sich dann, daß dieser „Lack" von purpurroter Farbe ist. Kernstruktur und Plasma sind deutlich zu erkennen. Im Plasma der Osteoblasten liegen schwarze Körnchen häufig an einem Kernpol zusammengedrängt in einem helleren Plasmabereich, dem sogenannten Golgifeld. Ost aber sind die schwarzen Körnchen diffus über das ganze Plasma verteilt. Die Körnchen sind vom Licht nicht durchstrahlbar und erscheinen tiefschwarz. Nach allem, was bisher über die histochemische Erfassungsmöglichkeit des Vitamin C bekannt ist, dürfen wir sie als die Lagerungsstätten des Vitamin C auffassen. Die Abb. 1 gibt in einer Zeichnung bei Immersionsvergrößerung einen Eindruck von der mengenmäßigen Verteilung und der Art der Lagerung des Vitamin C in den Osteoblasten. Die purpurrote Verfärbung der Osteoblasten ist durch einen dunkelgrauen Ton angedeutet. Das Bild zeigt, daß auch bereits eingemauerte Osteoblasten noch Vi-

tamin-C-Beladung zeigen und ebenso in dem den Knochenbälkchen zunächst anliegenden embryonalen Bindegewebe sich feinverteilte Körnchen finden. Weiter entfernt von den Knochenbälkchen lagerndes embryonales Bindegewebe ist frei davon. Günstig im Schnitt getroffene Osteoblasten zeigen in Kernnähe den Golgiapparat als netzartige Struktur mit Vitamin C beladen. Eine Erklärung für die purpurrote Verfärbung der Osteoblasten kann nicht gegeben werden. Möglicherweise handelt es sich um in feinster

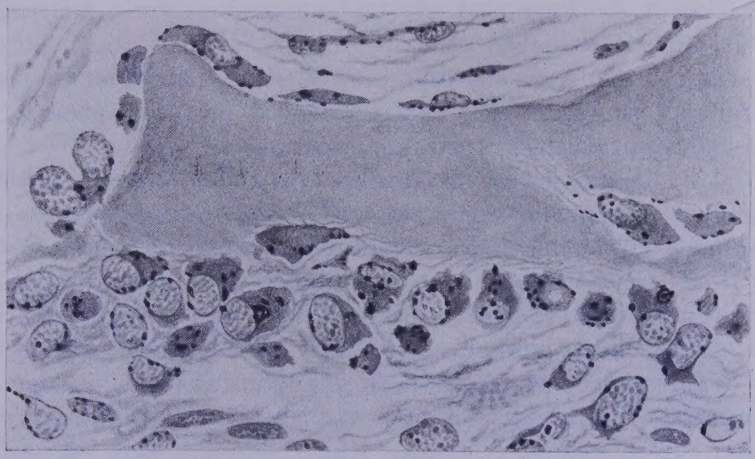


Abb. 1. Schweineembryo, 6 cm Scheitel-Steißlänge. Längsschnitt durch ein Knochenbälkchen des Femur. Vitamin-C-beladene Osteoblasten.

kolloidaler Form reduziertes Gold, durch eine in den Osteoblasten liegende Substanz; wahrscheinlich aber ist sie eine Folge der Entkalkungsprozedur durch Trichloressigsäure. Mit Ascorbinsäureanwesenheit hat sie sicherlich nichts zu tun, da diese das Goldchlorid zu metallischem Gold reduziert, das dann als tiefschwarzer, lichtundurchlässiger, granulöser Niederschlag erscheint, wie es auf der Abb. 1 erkennbar ist.

Die Frage nach der Bedeutung des Vitamin C für das Knochengewebe war bereits mehrfach Gegenstand experimenteller Prüfung. Schilowzew untersuchte als erster die Wirkung der Skorbutkost auf die Frakturheilung. Experimentell gesetzte Femurfrakturen zeigten bei Skorbutmeerschweinchen keinerlei Heilung. Zugabe von Zitronensaft zur Diätkost führte zur schnellen Heilung des Bruches. Zu gleichen Ergebnissen kamen Jessey und Korpassy, die die

Heilung von Schädeldachwunden unter den gleichen Gesichtspunkten bei Meerschweinchen untersuchten. Normal ernährte Kontrolltiere zeigten am sechsten Tage bereits ausgiebige Kallusbildungen, während Skorbuttiere nicht die geringste Neigung zur Heilung des Defektes zeigten. Hanke prüfte die gleiche Frage an Kaninchen und Meerschweinchen und kam zu ähnlichen Ergebnissen. Durch zusätzliche Vitamin-C-Verabreichung zur Normalkost bei Kaninchen, die ihren Eigenbedarf an Vitamin C durch Selbsterzeugung zu decken in der Lage sind, glaubte er eine Steigerung der Kallusbildung erzielt zu haben.

Diese letzte Frage überprüfte ich durch eine ähnliche Versuchsanordnung an einer Serie von viermal 3 Meerschweinchen, die jedesmal vom gleichen Wurf stammten.

Tier 1 bekam jeweils Skorbutkost (nach Demole), Tier 2 ausschließliche Grünfutterernährung und Tier 3 zur Grünfutterernährung noch größere Mengen Ascorbinsäure injiziert. Allen Tieren wurde an gleicher Stelle eine vollständige Femurfraktur gesetzt. Der Beginn der Skorbutkost lag jeweils 3—5 Tage vor der Operation. Die Untersuchung erfolgte am 6. Tage nach der Operation.

Während die auf Skorbutkost gesetzten Tiere keine oder nur angedeutete Kallusbildungen aufwiesen, zeigten die Vitamin-C-versorgten Tiere bereits reichliche Kallusbildung. Eine vermehrte Kallusbildung bei den zusätzlich mit Vitamin C versorgten Tieren gegenüber den normal ernährten Tieren ließ sich nicht feststellen. Für die bestmögliche Heilung einer Fraktur ist demnach völlige Absättigung des Organismus mit Vitamin C nötig, während zusätzliches Vitamin C überflüssig ist und zu keiner Beschleunigung der Heilung führt. Dabei aber ist zu berücksichtigen, daß eine normale Absättigung mit Vitamin C nur erreicht wird, wenn im Tierversuch frisches Grünfutter im Überfluß verabreicht wird. Wie hoch die Ascorbinsäuremenge ist, die beim Meerschweinchen zur völligen Sättigung nötig ist, haben die Untersuchungen Zilvas ergeben, der bei seinem Tiermaterial dazu pro Tier und Tag 30 mg benötigte, während die Zufuhr von 1,5 mg Vitamin C pro Tag schon genügt, um Skorbuterscheinungen zu verhüten. Man wird daher diese Zahlen zugrunde legen müssen, wenn man von normal mit Vitamin C versorgten Tieren spricht. Szent-Györgyi sieht 30 mg Vitamin C als Normalbedarf des Meerschweinchens an und glaubt, daß diese Menge notwendig ist, um optimale Gewebsleistungen zu garantieren.

Ist so durch die Ergebnisse des experimentellen Studiums der Knochenregeneration und durch den direkten Nachweis des Vitamin C in den Osteoblasten die Bedeutung des Vitamin C für das Knochenwachstum erwiesen, so fragt es sich, welche Bestandteile des Knochengewebes unter dem Einfluß des Vitamin C gebildet werden. Das Vorhandensein des Vitamin C in den Osteoblasten deutet darauf hin, daß es in Beziehung steht zu der Bildung der organischen Grundsubstanz des Knochens. Wie Tonutti früher zeigte, findet sich das Vitamin C immer dann in Zellen, wenn irgendwelche Synthese-Vorgänge in denselben vor sich gehen. Es ist daher zu vermuten, daß die Erzeugung der collagenen Fibrillen der Knochengrundsubstanz unter dem Einfluß von Vitamin C erfolgt. Über den Bildungsvorgang dieser Fibrillen herrscht noch keine Einigkeit. Vieles spricht dafür, daß die Fibrillen durch ein von Osteoblasten erzeugtes Ferment aus einer homogenen Grundsubstanz durch eine Art Ausfällungsvorgang entstehen (Robisonsches Ferment). Die Bedeutung des Vitamin C für den Aufbau der Knochensubstanz muß daher so formuliert werden, daß es entweder nötig ist für die Erzeugung der collagenen Fibrillen durch die Osteoblasten, oder für die Erzeugung eines Fermentes durch die Osteoblasten, das seinerseits erst auf chemisch-physikalischem Wege die Fibrillenentstehung bewirkt. Die Ergebnisse anderweitiger Untersuchungen bestätigen diese Anschauungen. Die chemisch-analytischen Untersuchungen des Skorbutknochengewebes (Bayer) zeigten normale Mineralzusammensetzung. Trotzdem ergaben Untersuchungen der Bruchfestigkeit eine erhebliche Herabminderung derselben. Es kann daher nur eine Veränderung in den organischen Grundsubstanzen vorliegen. Schließlich zeigte Mazoue noch auf anderem Wege die Bedeutung des Vitamin C für die Entstehung der collagenen Fibrillen im Bindegewebe. Erzeugung von Kieselgurgranulomen in der Bauchhöhle von Skorbutmeerschweinchen führte lediglich zu Zellanhäufungen um die Kieselgurpartikel, nicht aber zur Bildung collagener Fasern, wie das beim normalen Abkapselungsvorgang der Fall ist. Eine dreitägige Zufuhr von Zitronensaft führte sogleich zum Auftreten collagener Fasern. Das ist ein strikter Beweis für die Rolle des Vitamin C bei Syntheseleistungen der Zelle.

Quergestreifte Muskulatur.

Fertig-differenzierte quergestreifte Muskulatur ist an Vitamin C arm. Histochemisch läßt sich in den Muskelfasern kein Vitamin C nachweisen. Bisherige histochemische Vitamin-C-Untersuchungen ergaben, daß Zellen sich bei irgendwelchen Synthesevorgängen mit Vitamin C auffüllen. Es lag daher die Vermutung nahe, daß auch beim embryonalen quergestreiften Muskel zur Zeit der Fibrillenbildung Vitamin C zu finden sei.

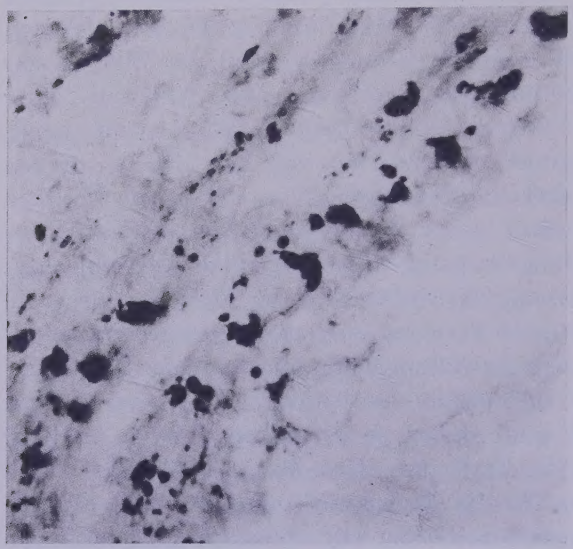
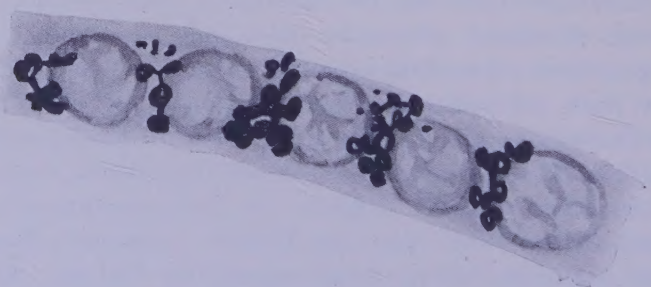


Abb. 2a und 2b. Schweineembryo, 6 cm Scheitel-Steißlänge.
2a) Foto: Imm. Winkel 1,3 Ok. 8. Längsschnitt zweier quergestreifter Muskelfasern. Vitamin C perinukleär am Golgiapparat sitzend.

Zur Untersuchung diente das gleiche Material wie bei der Knochengewebsuntersuchung, da das entnommene Femurstückchen nicht völlig von



2b) Zeichnung: Quergestreifte Muskelfaser von demselben Embryo wie 2a.

Weichteilen befreit wurde. Die unten gezeigten Bilder der Aufräumzellen bei Muskeldegeneration wurden mit Hilfe der $AgNO_3$-Methode nach Giroud und Leblond gewonnen.

Ganz junge Myoblasten, bei denen von Fibrillen selbst noch nichts zu erkennen ist, weisen die intensivste Vitamin-C-Beladung auf. Die Abb. 2a zeigt zwei solche Fasern im Längsschnitt. Die Kerne liegen noch zentral. An jedem Kern befindet sich ein dichter Knäuel von tiefschwarzen Granula. Meist sind die Granula dicht am Kernpol gelagert und stehen durch Fäden und Brücken miteinander in Verbindung. In dem dichten Plasmaschlauch, in dem die dichtgedrängten in Reihe stehenden Kerne lagen, finden sich nur spärliche isolierte Granula. Die Zeichnung der Abb. 2b gibt die Verhältnisse besser wieder, da die Körnchen in dem engen Plasmasaum zwischen zwei Kernen so dicht liegen, daß bei der photographischen Wiedergabe nur ein zusammenhängender Klumpen erscheint. Mit zunehmender Differenzierung nimmt der Vitamin-C-Gehalt beträchtlich ab. Fasern, die bereits Fibrillen im Innern enthalten, und in denen die Kerne allmählich voneinander gerückt sind, enthalten vielfach den ganzen Plasmabereich zwischen zwei Kernen mit schwarzen Körnchen übersät, während die bei jüngeren Stadien von den Körnern gebildeten zusammenhängenden Strukturen nicht mehr so klar zum Ausdruck kommen.

Auch hier erinnert die Art der Lagerung des Vitamin C wieder an den Golgiapparat. Weed und Macdougald, die den Golgiapparat in Muskelfasern mit der Osmiummethode und nach da Fano darstellten, gaben Bilder, die lagenmäßig durchaus mit dem übereinstimmen, was durch die Vitamin-C-Reaktion zur Anschauung gebracht wird. Dabei hebt Weed hervor, daß die Darstellung des Golgiapparates bei embryonalen Muskeln leichter gelingt, als bei ausdifferenzierten. Das spricht dafür, daß der Golgiapparat zu diesem Zeitpunkt in erhöhter Tätigkeit ist. Es erübrigt sich hier, auf die Beziehungen des Vitamin C zum Golgiapparat einzugehen, da dies von Tonutti andernorts schon geschehen ist. Nur eine Beobachtung Pfuhls bedarf noch der Erwähnung. Pfuhl verfolgte die Regeneration quergestreifter Muskelfasern im Trypanblauentzündungsherd. Er fand dabei, daß zu einem gewissen Zeitpunkt der Regeneration die ganz jungen Muskelfasern Trypanblaukörnchen zu speichern vermögen und zwar am Kernpol in einer Vakuole. Er hält die Ablagerungsstätte des gespeicherten Trypanblau für den Golgiapparat, fußend auf den Vorstellungen Nassonows. Auch diese Beobachtung darf dafür gewertet werden, daß erhöhte Stoffwechselvorgänge im regenerierenden Muskel herrschen und eine

erhöhte Aktivität des Golgiapparates zur Zeit der Fibrillensynthese besteht. Allerdings zeigen die Abbildungen Pfuhls, daß es sich nur um eine sehr spärliche, eben angedeutete Trypanblauablagerung handelt. Ich habe nun ähnliche Muskelnekrosen erzeugt, durch Essigsäure und dann die regenerierenden Fasern auf ihren Vitamin-C-Gehalt untersucht. Leider ist es nicht gelungen, ein den Pfuhl-schen Bildern entsprechendes Stadium zu finden. Möglicherweise aber ist der Vitamin-C-Anstrom zu gering, um histochemisch faßbar zu sein, da auch die Trypanblauspeicherung nur eben angedeutet ist, wie den Pfuhl'schen Bildern zu entnehmen ist.

Dagegen seien Beobachtungen erwähnt, die wir an den Aufräumezellen machen konnten. Pfuhl schreibt die wesentlichste Aufgabe dabei den Histiocyten zu. Diese wandern in die zerfallenden Muskelschläuche ein und bewerkstelligen die Aufräumearbeit der abgestorbenen Fasermassen. Bei den Pfuhl'schen Versuchen treten die Histiocyten klar zutage, da sie durch ihre grobe Trypanblauspeicherung kenntlich waren. Bei meinen Untersuchungen ergab sich nun, daß die die Aufräumearbeit leistenden Histiocyten mit C-Vitamin beladen sind. Die Abb. 3 gibt zwei solche Histiocytenschläuche wieder. In ihrem Innern liegen inmitten der zerfallenen Muskelsubstanz die mit schwarzen Körnchen erfüllten Histiocyten. Meist liegt hier das C-Vitamin diffus im ganzen Plasmaleib zerstreut. Bindegewebszellen in der Nähe degenerierender Muskelfasern zeigen keine oder nur eine ganz spärliche Beladung. Die Vitamin-C-Beladung ist auch bei den Histiocyten als Ausdruck ihrer Resorptions- und Verdauungsarbeit aufzufassen. Wie Tonutti und Matzner andernorts ausführten, steht die Vitamin-C-Beladung der Histiocyten mit ihrer Fermentsynthese in Verbindung. Diese Fermente

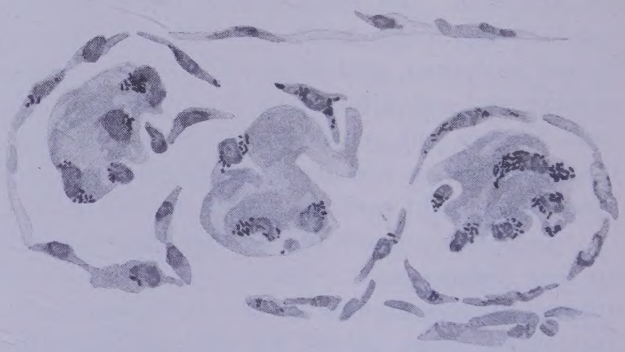


Abb. 3. Erwachsenes Meerschweinchen. Vitamin-C-beladene Histiocyten in zur Degeneration gebrachten quergestreiften Muskelfasern.

entstehen in den Histiocyten offenbar erst während ihrer Verdauungsarbeit, denn im normalen Gewebe, in ungereiztem Zustande, als „ruhende Wanderzellen" lagernde Freßzellen zeigen keine C-Vitamin-Beladung.

Zusammenfassung.

1. In den Osteoblasten läßt sich Vitamin C nachweisen. Die Vitamin-C-Beladung wird in Zusammenhang gebracht mit der Erzeugung der collagenen Fibrillen der Knochengrundsubstanz bzw. des zu ihrer Erzeugung nötigen Fermentes. Damit ergibt sich die Bedeutung des Vitamin C als Betriebsstoff knochenbildender Zellen.

2. Quergestreifte Muskulatur zeigt nur im embryonalen Zustande Vitamin-C-Beladung. Das Vitamin C liegt am Golgiapparat. Auf die Übereinstimmung mit den übrigen „Golgibildern" nach den üblichen Methoden wird hingewiesen. Der Golgiapparat der embryonalen Muskelfasern ist offenbar in erhöhter Tätigkeit.

3. Bei der Degeneration quergestreifter Muskulatur geschieht die Aufräumearbeit durch Vitamin C beladene Histiocyten.

Schrifttum.

Bayer, Zieglers Beiträge Bd. 87, S. 204, 1931.
Deineka, Anat. Anz. Bd. 46, S. 97, 1914.
Demole, Cahen, Pfalz, Klin. Wschr. 1935, Nr. 27, S. 966.
Hanke, Dtsch. Z. Chir. Bd. 245, S. 530, 1935.
Jessey u. Korpassy, Zentr. Bl. Chir. Bd. 90, S. 2836, 1934.
Kollath, Arch. exp. Path. u. Pharm. Bd. 167, S. 469, 1932.
Macdougald, Z. Zellf. Bd. 24, S. 399, 1936.
Mazoue, H., Arch. d'Anat. mikr. Bd. 33, S. 129, 1937.
Pfuhl, Z. f. Zellf. u. mikr. Anat. Bd. 26, S. 565, 1937.
Pfuhl, Z. f. mikr.-anat. Forsch. Bd. 41, S. 569, 1937.
Schilowzew, D. Z. Chir. Bd. 209, S. 320, 1928.
v. Szent-Györgyi, Verhandl. d. Deutsch. Ges. f. Innere Med. 1934, S. 426.
v. Szent-Györgyi, Deutsche Med. Wo. 1937, Nr. 48, S. 1789.
Tonutti, Ztschr. f. Klin. Med. Bd. 132, S. 443, 1937.
Tonutti u. Matzner, Klin. Wschr. Nr. 2, S. 63, 1938.
Weed, I. G., Z. f. Zellf. Bd. 25, S. 516, 1936.

Lebenslauf.

Am 15. Mai 1911 wurde ich in Dittersbach Kreis Waldenburg in Schlesien, als Sohn des Lehrers Lothar Klein und seiner Ehefrau Wally, geborene Kammler, geboren und im katholischen Bekenntnisse meiner Eltern getauft und erzogen. Mein Vater wurde dann nach Bärengrund versetzt, wo ich auch in die Volksschule kam und dort bis Ostern 1922 blieb. Von da ab besuchte ich das Gymnasium in Waldenburg bis zur Reifeprüfung im Jahre 1933. Unmittelbar nach der Reifeprüfung habe ich mich freiwillig zum Arbeitsdienst gemeldet und war dort vom 13. 5. 1933 bis 30. 9. 1933. Das Studium der Medizin begann ich auf der Universität zu Breslau mit dem WS 1933/34. An der gleichen Hochschule bestand ich am 1. 4. 1935 die ärztliche Vorprüfung und am 14. 4. 1939 das ärztliche Staatsexamen. Ich besitze die deutsche Reichsangehörigkeit und bin arischer Abstammung.

An dieser Stelle sei mir gestattet, Herrn Professor Dr. W. Blotevogel und Herrn Dr. med. Tonutti für ihre Hinweise und ihr Entgegenkommen herzlich zu danken.

Lothar Klein.